

31.5.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 4月23日
Date of Application:

出願番号 特願2003-118999
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2003-118999]

| |
|-------------------|
| REC'D 22 JUL 2004 |
| WIPO PCT |

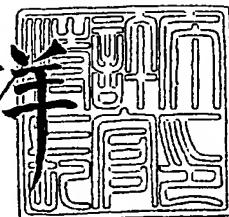
出願人
Applicant(s): 佐藤 由紀夫
大正製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

八 月 洋



【書類名】 特許願

【整理番号】 00TS-P3478

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 福島県福島市上浜町16-31

【氏名】 佐藤 由紀夫

【発明者】

【住所又は居所】 福島県福島市黒岩字浅井63-1すぎのガーデン203

号

【氏名】 小林 浩子

【特許出願人】

【識別番号】 598009625

【氏名又は名称】 佐藤 由紀夫

【特許出願人】

【識別番号】 000002819

【氏名又は名称】 大正製薬株式会社

【代表者】 上原 明

【代理人】

【識別番号】 100115406

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐鳥 宗一

【電話番号】 03-3985-1147

【選任した代理人】

【識別番号】 100122437

【弁理士】

【氏名又は名称】 大宅 一宏

【選任した代理人】

【識別番号】 100074114

【弁理士】

【氏名又は名称】 北川 富造

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003551

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0217520

【包括委任状番号】 0217879

【包括委任状番号】 9703058

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メチル化C p G ポリヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C p G モチーフのグアニンをメチル化した C p G ポリヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号1～4のいずれかに記載の配列からなるポリヌクレオチド

。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチドを有効成分とする免疫疾患の予防又は治療のための医薬組成物。

【請求項5】 免疫抑制剤である請求項4記載の組成物。

【請求項6】 関節炎治療剤である請求項4記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C p G モチーフの免疫活性を抑制するポリヌクレオチド及び関節炎を効果的に抑制するポリヌクレオチド並びにこれらを有効成分とする医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

微生物由来の成分は免疫活性を有するが、特に結核菌の菌体成分の中に多く含まれるDNAは強い自然免疫活性化作用を有し、抗原に対しT helper 1タイプの免疫反応を誘導するアジュバントとして働くことが知られている（非特許文献1）。そして、このDNAの免疫活性化作用はC p Gモチーフを有するDNA（C p G DNA）に由来し、配列の変更あるいはシトシンのメチル化によってその免疫活性は失われることが知られている（非特許文献2）。

【0003】

一方、この微生物由来DNAが関節リウマチを始めとする自己免疫疾患の病態

に関わっている可能性を示唆する報告もある（非特許文献3）。

【非特許文献1】Science 273; 352-354, 1996

【非特許文献2】Nature 374; 546-549, 1995

【非特許文献3】Arthritis Rheum 43; 2578-2582, 2000, Nature 416; 603-607
, 2002

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、CpG DNAの免疫活性及び関節炎を効果的に抑制・治療する薬剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、グアニンをメチル化したCpGモチーフを有するDNAを投与することにより、インターロイキン6 (IL-6) 及び12 (IL-12) の産生を効果的に抑制することを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明の1態様によると、CpGモチーフのグアニンをメチル化したCpG ポリヌクレオチドを提供する。

また、本発明の他の態様によると、配列番号1～4のいずれかに記載の配列からなるポリヌクレオチドを提供する。

また、本発明の他の態様によると、上記ポリヌクレオチドを含有することを特徴とするポリヌクレオチドを提供する。

また、本発明の他の態様によると、上記ポリヌクレオチドを有効成分とする免疫疾患の予防又は治療のための医薬組成物を提供する。

また、本発明の他の態様によると、免疫疾患抑制剤である上記組成物を提供する。

また、本発明の他の態様によると、関節炎治療剤である上記組成物を提供する。

。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】**(ポリヌクレオチド)**

本発明のポリヌクレオチドは、グアニンのメチル化されたCpGモチーフを含むことを特徴とするポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを意味し、1本鎖であっても2本鎖であってもよく、また、直鎖状であっても環状であってもよい。ポリヌクレオチドの大きさは、細胞への取り込みを容易にするため8~100ヌクレオチドであることが好ましい。さらに好ましくは8~30ヌクレオチドである。

【0009】

CpG モチーフのCは、メチル化されていないシトシンを塩基として有するリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドであっても、メチル化されたシトシンを塩基として有するものであってもよい。インターロイキン6及び12産生抑制試験の結果から本発明のポリヌクレオチドはメチル化されたシトシンのCpG モチーフを含むものであっても、メチル化していないシトシンのCpG モチーフを含むものであっても同等の抑制作用を示すことが確認された。

【0010】

CpG モチーフのメチル化されたGとは、メチル化されたグアニンを塩基として有するリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを意味する。メチル化される部位は、グアニンの2位、6位、7位などを挙げることができるが、好ましくは6位ケトン基のメチル化である。

【0011】

CpG モチーフ以外のヌクレオチドは、ピリミジン又はプリンで置換されたりボース又はデオキシリボースであり、具体的には、グアニン、アデニン、シトシン、チミン、ウラシルを塩基として有するリボース又はデオキシリボースである。これらのヌクレオチドは、CpG モチーフの免疫抑制作用が損なわれない限り、ヌクレオチドの誘導体と置換することもできる。

【0012】

このようなポリヌクレオチドを有する核酸の基本配列は

5'-purine-purine-CmG-pyrimidine-pyrimidine

を有し、

5'-TCCATGACCmGTTCCTGATGCT-3'

5'-TCCATGTCCmGTCCCTGATGCT-3'

5'-GCTAGACCmGTTAGCGT-3'

5'-TCCATAACCmGTTCCTGATGCT-3'

などを挙げることができる。

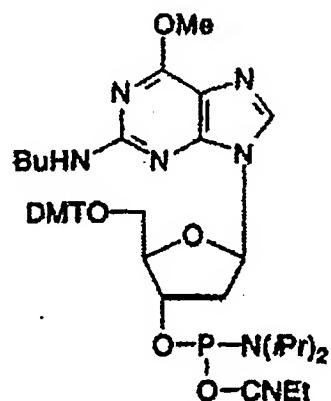
【0013】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子組換技術、核酸合成法、部位特異的変異導入法により得られうる。例えば、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、遺伝子工学で一般的に用いられる核酸合成法に従い、例えば、DNA合成装置を用いて直接合成してもよく、これらのポリヌクレオチドの1部を合成した後PCR法又はクローニングベクター等を用いて増幅してもよい。さらに細胞内であり安定なポリヌクレオチド誘導体を得るために、塩基、糖、リン酸部分を化学修飾してもよい。前記ポリヌクレオチド合成法としては、リン酸トリエステル法、ホスホルアミダイト法、H-ホスホネート法等が挙げられる。

ゲアニンの6位がメチル化されたポリヌクレオチドは、例えば

【0014】

【化1】



6-Me-2'-deoxyGuanosine

【0015】

を原料とすることにより製造することができる。

【0016】

(免疫疾患の予防又は治療のための医薬組成物)

本発明の免疫疾患の予防又は治療のための医薬組成物は、試験例で示すようにマウス骨髓由来マクロファージをCpG DNA等で刺激した際のインターロイキン産生を抑制し、さらにマウスタイプIIコラーゲン関節炎モデルにおいて関節炎を抑制することが確認された。したがって、本発明の組成物は免疫抑制作用を有し、例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、糖尿病、多発性硬化症、橋本病、溶血性貧血、重症筋無力症、強皮症、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病等の自己免疫疾患、慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患、移植片対宿主病、臓器移植時の拒絶反応、エンテロトキシンによる免疫系の活性化が病因因子とされている急性感染症、動脈硬化に有用であることがわかる。

【0017】

本発明のポリヌクレオチドを医薬組成物の形態で使用する場合には、上記ポリヌクレオチドを有効成分として使用し、さらに薬学的に許容可能な担体、希釈剤、安定化剤、賦形剤などを用いて医薬組成物を調製することができる。

【0018】

患者への投与は、たとえば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などの当業者に公知の方法により行うことができる。投与量は、患者の体重、年齢、投与方法などのより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。有効成分であるポリヌクレオチドの投与量としては、一般的には1回につき0.1~100mg/kg程度である。

【0019】

【発明の効果】

本発明のポリヌクレオチドは、CpG DNAによるIL-6、IL-12の産生を効果的に抑制するため、関節リウマチ等の自己免疫疾患、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患、多発性骨髄腫、メサンギウム増殖性腎炎などの予防・治療に利用することができる。

【0020】**【実施例】**

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0021】**試験例 1****(方法)**

BMDMの誘導とサイトカインの測定は、Martin-Orozcoらの方法に準じて行った（Int Immunol 1999, 11: 1111-1118）。

【0022】

BALB/cマウスの骨髄細胞から誘導したbone marrow derived macrophage (BMDM)を 2×10^5 /mlに調整し、CG-DNA (1 mg/ml)、mCG-DNA (10 mg/ml)、CmG-DNA (10 mg/ml)、LPS (100 ng/ml, E. coli O111:B4 (Sigma L-4391))と共にDMEM培地 (sigma社) にて24時間培養した。24時間後に回収した培養上清中のIL-12及びIL-6濃度をELISAにて測定した（図1）。有意差検定はStatViewを用いて行った。

【0023】

なお、合成DNA (いずれも5'-S化リン酸化、1microHPLC精製品) は、 β -シアノエチルアミダイト法により合成し、当業者が通常行う方法により精製したものを用いた。

CpGモチーフを含むDNA (CG-DNA) : 5'-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3'

CpGモチーフのCをメチル化したDNA (mCG-DNA) : 5'-TCCATGAmGTTCCTGATGCT-3'

CpGモチーフのGをメチル化したDNA (CmG-DNA) : 5'-TCCATGACmGTTCCTGATGCT-3'

（試験例において、mC: 5-methyl-2'-deoxycytidine、mG: 06-methyl-2'-deoxyguanosineを表す。）

【0024】**(結果)**

マウス骨髄由来マクロファージを *in vitro* で LPS 又は CG-DNA と共に、 mCG-DNA 又は CmG-DNA を添加して培養した。24時間後の培養上清中の IL-12 及び IL-6 濃度を測定した。CG-DNA によるマクロファージからの IL-12 及び IL-6 誘導は、 mCG-DNA あるいは CmG-DNA によって抑制されたが、 CmG-DNA の方が mCG-DNA より抑制効果が高い。また、 LPS による IL-6 誘導を CmG-DNA は抑制せず、 mCG-DNA はかえって増強することが示された。

【0025】

試験例 2

(方法)

マウスタイプIIコラーゲン関節炎モデル試験は、 Current protocols in immunology: 15.5.1-15.5.14. に準じて行った。

【0026】

DBA/1LacJマウス（8週齢雌）をタイプIIコラーゲン (CII)（高研）及び Complete Freund Adjuvant (DIFCO) で免疫し、その3週間後にタイプIIコラーゲン及び Incomplete Freund Adjuvant で boost し、タイプIIコラーゲン関節炎モデルを作成した。

【0027】

このマウスに下記の如く合成DNAを皮下投与し、週1回関節炎スコアを測定した。関節炎スコアは、 Current protocols in immunology に従った。

【0028】

【表1】

| | 投与量 | 投与方法 |
|-----|---------------------|-------------------------------|
| CII | 200 µg | s.c.; at the hip |
| CFA | equal volume to CII | s.c.; at the hip |
| IFA | equal volume to CII | s.c.; at the hip |
| CmG | 50 µg | i.d.; at the base of the tail |

【0029】

CII: タイプIIコラーゲン、CFA: Complete Freund Adjuvant

IFA: Incomplete Freund Adjuvant、CmG: CmG-DNA

【0030】

【表2】

| | day 0 | day +21 |
|--------------|-------------|-------------|
| CII | CII/CFA | CII/IFA |
| CII/CmG (0) | CII/CFA+CmG | CII/IFA |
| CII/CmG (21) | CII/CFA | CII/IFA+CmG |

【0031】

(結果)

最初の免疫 (day 0)、あるいは3週間後のboost時 (day 21) にCmG-DNAを投与すると、関節炎が抑制された。

以上の結果からCmG-DNAは特異的に、かつこれまで知られた合成DNA以上に効果的に toll like receptor (TLR) 9を阻害し、自己免疫性疾患の治療に有用と考えられた。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Yukio Sato

<110>TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120>methylated CpG polynucleotide

<130>00TS-P3478

<160>6

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified base

<222>9

<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine

<400>1

tccatgacgt tcctgatgct 20
<210>2
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>modified base
<222>9
<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine
<400>2
tccatgtcgt ccctgatgct 20
<210>3
<211>15
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>modified base
<222>8
<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine
<400>3
gcttagacgtt agcgta 15
<210>4
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>modified base
<222>9
<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine

<400>4

tccataacgt tcctgatgct 20

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>1

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified base

<222>8

<223>5-methyl-2' -deoxycytidine

<400>6

tccatgacgt tcctgatgct 20

【図面の簡単な説明】**【図1】**

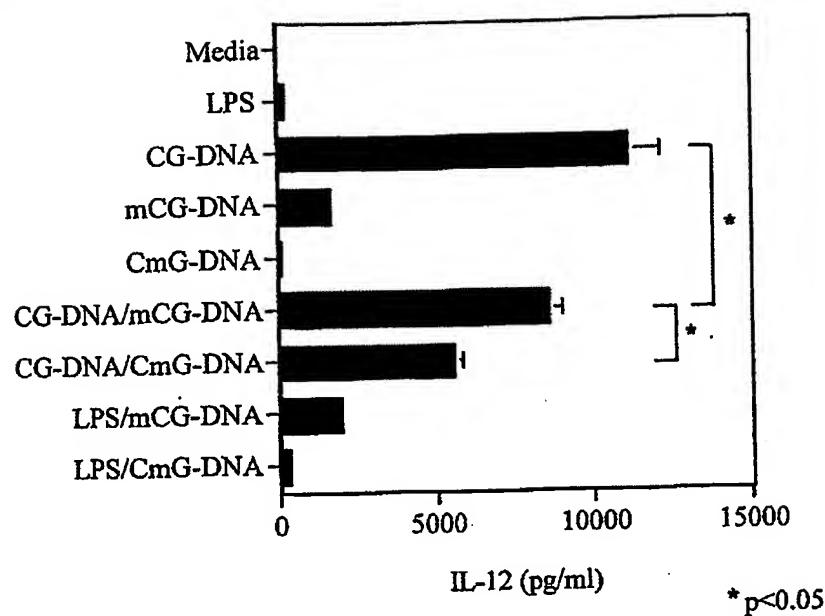
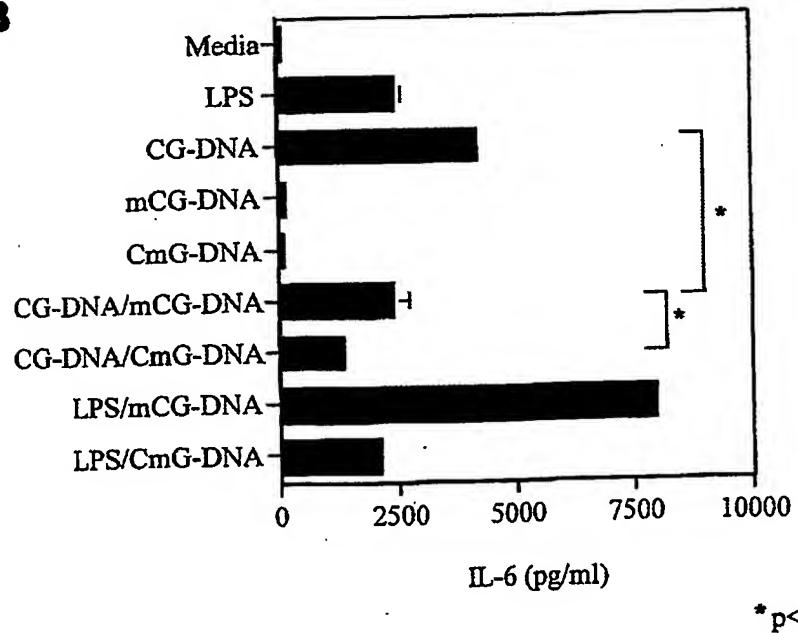
図1は、mG-DNAあるいはCmG-DNAによるマクロファージからのIL-12及びIL-6誘導抑制の結果を表す。

【図2】

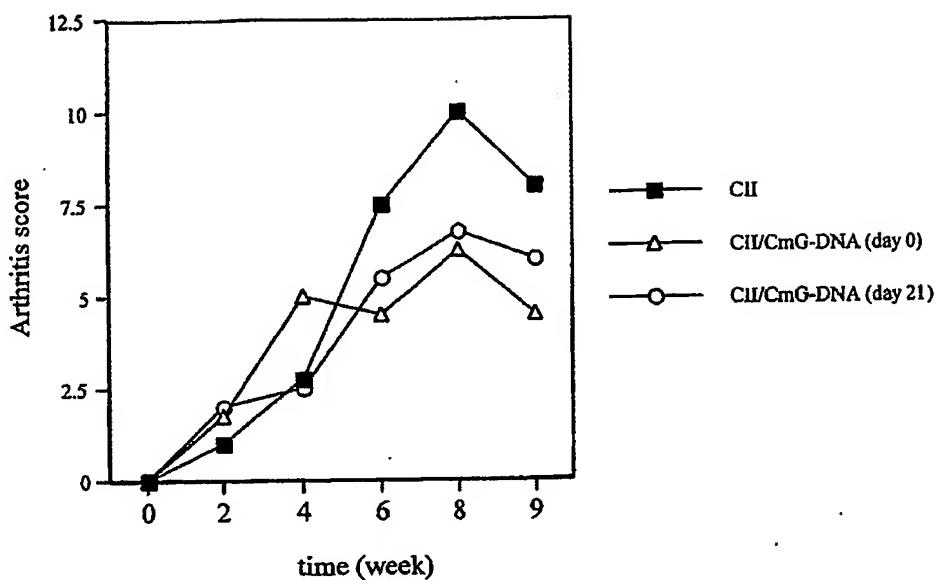
図2は、タイプIIコラーゲン関節炎モデルに対するCmG-DNAの効果を表す。day0は、最初の免疫時にCmG-DNAを投与したことを表し、day 21は3週間後のboost時に投与したことを表す。

【書類名】 図面

【図1】

A**B**

【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

CpG モチーフの免疫活性および関節炎を効果的に抑制する薬剤を提供する。

【解決手段】

CpGモチーフのグアニンをメチル化したCpGポリヌクレオチド。

【選択図】 図1

認定・付加情報

| | |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2003-118999 |
| 受付番号 | 50300680515 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第六担当上席 0095 |
| 作成日 | 平成15年 4月24日 |

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 4月23日

次頁無

出証特2004-3058916

特願 2003-118999

出願人履歴情報

識別番号 [598009625]

1. 変更年月日 1998年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住所 福島市渡利字柳小路59-2 コーポカンノ202号
氏名 佐藤 由紀夫

特願 2003-118999

出願人履歴情報

識別番号 [000002819]

1. 変更年月日 1990年 8月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都豊島区高田3丁目24番1号
氏 名 大正製薬株式会社